

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer

**Die Bestimmung der Erythrozyten- und Leukozytenzahl in Blut,
Harn und Knochenmarksbröckel mit dem elektronischen Gerät
» CELLOSCOPE «**

Auszug aus der
Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau

1962
vorgelegt von

Elisabeth Baumgarten

aus

Stuttgart

1962

Sonderdruck aus: „Folia haematologica, Neue Folge“, 7, 1, 1963
Herausgegeben von Prof. Dr. H. Schulten und Prof. Dr. L. Heilmeyer

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik Freiburg/Br.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. L. HEILMEYER)

Bestimmung der absoluten Zellzahl im Knochenmarkbröckel*

Von E. BAUMGARTEN und K. G. v. BOROVICZÉNY

Mit 2 Tabellen



AKADEMISCHE VERLAGSGESELLSCHAFT
FRANKFURT AM MAIN

1963

Bei der Beurteilung von Knochenmarkpunktaten ist neben der qualitativen Zellverteilung der quantitative Zellreichtum oder die Zellarmut des Knochenmarkes von sehr großer Bedeutung. Wie ROHR (12) ausführt: „Es ist ohne weiteres klar, daß die Bestimmung der absoluten Zellzahlen des Knochenmarkes in mancher Beziehung außerordentlich erwünscht wäre. Sie gäbe uns ein Maß über die Knochenmarkstätigkeit in die Hand, dem wir im Zusammenhang mit der feineren Morphologie manche wertvollen Aufschlüsse verdanken. Wenn trotz verzweifelter Versuche in dieser Richtung die Zählungen keine allgemeine Verbreitung gefunden haben, so liegt dies in der großen Fehlerbreite der Methode, die die Mühe nicht zu lohnen scheint.“ Bei der Durchsicht der Literatur findet man in den letzten 50 Jahren zahlreiche diesbezügliche Versuche. Es wurden die verschiedensten Methoden angewendet und man fand 10 000–1,5 Mill. Zellen pro mm^3 . Diese außerordentlich großen Schwankungen dürften neben der insuffizienten Zählmethode darauf zurückzuführen sein, daß einige Autoren sich mit der Bestimmung der Zellzahl im Knochenmarkblut begnügten, andere die Knochenmarkbröckel nicht genügend aufarbeiteten. Die Blutbeimengung ist von Punktion zu Punktion verschieden, Anhaltspunkte über die Knochenmarkstätigkeit ergeben nur die Zellzahlen der reinen Kno-

* Mit Hilfe eines Bundeszuschusses. Kurzfassung eines Teiles der Dissertationsarbeit von E. BAUMGARTEN.

chenmarksbröckel. Wir haben versucht, eine einfache, im Routinebetrieb durchführbare Methode auszuarbeiten, mittels derer eine verlässliche Aussage über die Zellzahl der Knochenmarksbröckel erhalten wird.

Das Prinzip der Methode ist folgendes: Die bei der Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarksbröckel werden gewaschen, gewogen, zerkleinert, danach werden die Zellen möglichst quantitativ eluiert, suspendiert und mit einem elektronischen Gerät gezählt. Die Ergebnisse werden in Zellzahl pro Milligramm Bröckelsubstanz angegeben.

Methodik

Die Sternalpunktion wird l. a. durchgeführt; d. h. nach entsprechender Lokalanästhesie und intrasternaler Anästhesie (1) werden möglichst viel Markbröckel (vermischt mit Knochenmarkblut) in eine trockene Rekordspritze aspiriert. Ein kleiner Teil der Punktionsflüssigkeit wird auf einen Objektträger gebracht, von diesem Objektträger lassen wir das Knochenmarkblut auf einen anderen Objektträger abtropfen. Vom ersten Objektträger werden die Knochenmarkbröckel präpariert und zu Quetschpräparaten ausgestrichen, vom zweiten Objektträger kann mittels einer SAHLI-Pipette 0,020 ml aufgezogen und 1:200 mit dem üblichen TRIS-Puffer (2) verdünnt werden. Der größere Teil des Punktionsmaterials wird aus der Spritze in ein oder mehrere Zentrifugenröhrchen entleert, die etwa 1 ml 3,8%ige Natriumzitratlösung enthalten. Diese Zentrifugengläschen werden dann mit physiologischer NaCl-Lösung aufgefüllt, der Inhalt durch mehrmaliges Umkippen vermischt. Nach kurzer Zeit sedimentieren die Markbröckelchen (man kann auch kurz zentrifugieren), danach werden die überstehende Flüssigkeit abgesaugt und die Bröckel auf ähnliche Weise noch 1–2 mal in NaCl ausgewaschen. Anschließend wird das Zentrifugengläschen mit der Öffnung nach unten für einige Minuten auf ein Filterpapier gestellt.

In kleinste Reagenzgläsern mit etwa 2 ml Inhalt wird genau 1,00 ml AB.-Serum pipettiert; die Gläsern werden mit einem Gummistopfen verschlossen und auf der analytischen Waage exakt gewogen. Anschließend werden die gereinigten Bröckel mit einem kleinen VOLKMANN-Löffelchen in das Serum gebracht, das kleine Röhrchen wird wieder gut verschlossen und nochmals gewogen. Zwischen den zwei Wägungen sollte möglichst wenig Zeit vergehen, damit kein Serum verdunsten kann. Die Differenz der beiden Wägungen ergibt die Menge der eingebrachten Markbröckel. Nach dem Wiegen werden die Bröckel im Serum mit einem Glasstab mechanisch zerkleinert, das Röhr-

chen wird wieder verschlossen und für etwa eine Stunde bei 37° C in einen Brutschrank gestellt.

Die Zählung sollte mit einem elektronischen Blutkörperchenzählautomaten durchgeführt werden, da dies wesentlich genauere Ergebnisse gibt als die Kammerzählung. Wo noch kein Zählgerät vorhanden ist, muß die Zählung natürlich doch in der Kammer durchgeführt werden. Es wird dann einfach das aus dem Brutschrank entnommene Röhrchen einige Male umgekippt und das die Zellsubstanz enthaltende Serum in die Kammer gefüllt. Die Zählung kann im Phasenkontrast, aber auch im Hellfeld mit eingengter Kondensorblende durchgeführt werden. Je nach Zelldichte wird die Zählung in den großen oder kleinen Quadraten durchgeführt, anschließend die Zellzahl pro Kubikmillimeter berechnet, das Ergebnis durch das Bröckelgewicht in Milligramm geteilt und mit 1000 multipliziert. Es sollten mehrere hundert Zellen gezählt werden. In einigen Fällen haben wir zu Vergleichszwecken auch die Kammerzählung angewandt.

Zur Zählung in einem elektronischen Zählgerät muß eine Verdünnung hergestellt werden, welche je nach Bröckelgewicht verschieden ist. Bei dem von uns verwendeten Apparat „Celloscope“ erwies es sich als nützlich, den Verdünnungsfaktor so zu wählen, daß er etwa das 20–40fache des Bröckelgewichtes in Milligramm betrug. Betreffend der genauen Beschreibung und Arbeitsweise dieses Apparates sei auf unsere frühere Veröffentlichung (2) verwiesen.

Die Berechnung der absoluten Zellzahl pro Milligramm Knochenmarkbröckel wird beim „Celloscope“ wie folgt durchgeführt: Das Zählvolumen im Celloscope beträgt 0,512 ml, das Zählwerk des Apparates registriert jede 64. gezählte Zelle. Entsprechend wird der abgelesene Wert mit 125 und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, das Ergebnis dann durch das Gewicht der Knochenmarkbröckel in Milligramm geteilt.

Wird mit Coulter-Counter gezählt (Zählvolumen 0,500 ml, die Zahl aller gezählten Zellen kann abgelesen werden), so ist die Berechnung noch einfacher: Der doppelte Verdünnungsfaktor wird durch das Bröckelgewicht geteilt.

Beispiel: Das Gewicht der Knochenmarkbröckel beträgt 14,4 mg, man wählt also eine Verdünnung 1:400. Nach Durchführung der Zählung zeigt das Celloscope die Zahl 334. Berechnung:

$$\frac{334 \cdot 125 \cdot 400}{14,4} = \frac{16\,704\,000}{14,4} = 1,16 \cdot 10^6.$$

Unter denselben Bedingungen hätte man im Coulter-Counter die Zahl 20 880 abgelesen.

Berechnung:

$$\frac{20\,800 \cdot 2 \cdot 400}{14,4} = \frac{16\,704\,000}{14,4} = 1,16 \cdot 10^6.$$

Zur Bestimmung der Zellzahl im Knochenmarkblut verfährt man wie sonst bei der Erythrozytenzählung. Aus der wie oben beschrieben hergestellten ersten Verdünnung (1:200) wird die zweite Verdünnung hergestellt (beim Celloscope 1:400, beim Coulter-Counter 1:250), als Verdünnungslösung kann hier physiologische NaCl-Lösung verwendet werden, dann wird im Apparat gezählt und das Ergebnis wie bei der Erythrozytenzählung berechnet.

Ergebnisse und Diskussion

Unsere Befunde sind in die Tab. 2 eingetragen, wobei wir die Fälle nach der gefundenen Zellzahl geordnet haben. Beim Vergleich mit den Befunden anderer Autoren fanden wir eine recht gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die ISAACS mitgeteilt hat (8–10), wie dies bei der Ähnlichkeit der Methoden auch zu erwarten war. Auch SANDKÜHLER fand ähnliche Zahlen, er untersucht auch nur reine Bröckel-
ausstriche, allerdings mit einer ganz anderen – zweidimensionalen – Methode. Die Anzahl der von uns untersuchten Knochenmarkpunktate ist noch zu gering, um weitgehende Interpretationen abzuleiten, ins Auge fällt lediglich, daß alle Fälle mit einer chronischen Lymphadenose, Myelose, Polyzythämie und Erythroleukämie in einer Gruppe zusammen liegen. Die Normalwerte dürften bei $0,6\text{--}0,8 \cdot 10^6/\text{mg}$ liegen. Für die Reproduzierbarkeit der Befunde spricht, daß die Ergebnisse bei Mehrfachbestimmungen, unabhängig von der jeweils eingewogenen Bröckelmenge, gut übereinstimmten; die Differenz der Einzelbestimmungen hat nur in einem einzigen Fall mehr als $\pm 5\%$ betragen, und dieser einzige Fall lag am Anfang unserer Untersuchungsreihe, als wir die neue Methode offenbar noch nicht wirklich beherrschten.

Gleichzeitige Zellzahlbestimmungen am Markblut ergaben sehr unterschiedliche Befunde: Nach Saponinhämolyse fanden wir 5000 bis 260 000 Zellen pro μl Knochenmarkblut, wobei eine Gegenüberstellung mit den Zellzahlen im Knochenmarkbröckel die Überlegenheit der letzteren Methode zeigte. In einzelnen Fällen haben wir auch Zählungen in der Kammer durchgeführt, die der Ungenauigkeit der Kammerzählmethode entsprechende Abweichungen zeigten.

Gewisse methodische Schwierigkeiten zeigen sich bei der Aufarbeitung stark fetthaltiger Markbröckelchen, da diese nicht sedimentieren, sondern auf der Kochsalzlösung schwimmen. Hier muß beim Waschen der Bröckel die Flüssigkeit mittels einer PASTEUR-Pipette vorsichtig abgesaugt werden, die Bröckelchen setzten sich dann an die Glaswand an und können von dort ins Serum gebracht werden, wo nach der mechanischen Zerkleinerung das freigewordene Fett schwimmt, die Zellen und die Fasersubstanz der Bröckelchen aber im Serum suspendiert bleiben bzw. sedimentieren. Bei Punktaten, die sowohl fettreiche, wie auch spontan sedimentierende Bröckel enthielten, fanden wir bei der gesondert durchgeführten Zellzahlbestimmung in den „schwimmenden“ Bröckelchen wesentlich weniger Zellen, als in den sedimentierten Bröckelchen. Mehrfachbestimmungen in diesen Fällen ergaben natürlich voneinander abweichende Ergebnisse, in der Tabelle sind nur die errechneten Mittelwerte angegeben.

Wie bereits aus den Untersuchungen von FELDSTEIN (5) bekannt ist, kann durch Serum der Zellgehalt der Markbröckelchen weitgehend eluiert werden. Wir haben die im Serum nach der Inkubation sedimentierten Bröckelchenreste regelmäßig ausgestrichen, nach PAPPENHEIM gefärbt und untersucht. Wir fanden, daß nach der weiter oben beschriebenen mechanischen Zerkleinerung der Bröckel und anschließender Inkubation im Brutschrank die ausgestrichenen Bröckelreste weitgehend zellfrei waren – mit der von uns beschriebenen Methode dürfte

Tabelle 1

Autor, Jahr, Literaturstelle	Methode	Zellzahl 10 ⁶ /μl
LOSSEN, 1910 (11)	Postmortal gewonnenes Knochenmark mit CH ₃ COOH verdünnt und mit Glasperlen verrieben	0,27–1,5
ISAACS, 1932 (9)	Postmortal gewonnene Knochenmarkbröckel in Serum suspendiert	0,9–1,0
SEGEDAHL, 1935 (17) .	Ersten Tropfen der Punktionsflüssigkeit mit NaCl verdünnt	0,01–0,25
GREIF, 1937 (7)	Verriebene Markbröckel, oder Knochenmarkblut mit TÜRKSEHER Lösung verdünnt	0,04–0,15
VOGEL, BASSEN, 1939 (18)		0,2–0,3
DIWANY, 1940 (3)		0,11–0,42
SANDKÜHLER, GROSS, 1956 (14)	Mit Spezialokular am Quetschpräparat gezählt	0,4/cm ²

also in sehr guter Annäherung die tatsächliche Zellzahl im Knochenmarkbröckel bestimmbar sein.

Weitere Untersuchungen, die sich auf Bestimmung der Zellvolumen-Verteilungskurven der Markbröckelzellen vor und nach Saponinhämolyse bezogen, scheinen dahinzudeuten, daß auch gewisse Aussagen bezüglich der quantitativen erythropoetischen Marktätigkeit an Hand der elektronischen Zählung möglich sein dürften. Diese Fragestellung bedarf aber noch einer eingehenden Untersuchung und soll zu einem späteren Zeitpunkt ausführlicher besprochen werden.

Tabelle 2

Name, Geschlecht, Alter	Diagnose	Untersuchte Markbröckel in mg	Zellzahl in 10 ⁶ /mg
1. B. F. ♂ 50	Kälteagglutininkrankheit	12,0	0,32
2. G. G. ♂ 60	Struma maligna (hämatologisch unauffällig)	4,3	0,58
3. R. E. ♀ 54	Plasmozytom (Hämopoese noch voll erhalten)	20,2	0,66
		58,7	0,61
		5,7	0,63
4. G. A. ♂ 57	Angedeutete Anämie	3,4	0,72
5. V. W. ♂ 24	Gesundbefund	6,3	0,79
6. G. B. ♂ 58	Angedeutete Anämie	35,7	0,85
7. V. P. ♀ 48	Vasculitis nodosa	32,1	1,01
8. W. K. ♀ 23	Essentielle Thrombopenie	1,4	1,03
9. J. J. ♀ 75	Sideroachretische Anämie	9,6	1,09
10. H. H. ♂ 53	Chronische Lymphadenose	10,4	1,13
11. S. M. ♀ 47	Chronische Lymphadenose	1,4	1,14
12. G. C. ♂ 57	Chronische Myeloe	27,8	1,17
13. M. E. ♂ 56	Polycythaemia vera	1,8	1,24
14. H. O. ♂ 61	Polycythaemia vera	39,9	1,29
		49,1	1,23
		36,4	1,29
15. L. E. ♂ 36	Chronische Erythroleukämie	20,2	1,32
		22,3	1,28
		16,0	1,86
16. R. K. ♀ 42	Splenomegale Markhemmung (Banti-Syndrom)	2,8	1,68
17. K. R. ♀ 21	Splenomegale Markhemmung (toxisch)	2,3	1,90
18. D. A. ♂ 47	Splenomegale Markhemmung (Banti-Syndrom)	35,4	2,20
		4,3	3,14
19. I. H. ♀ 54	Akute Myelose	4,3	3,14
20. R. K. ♂ 7	Kongenitale Sphärozytose	2,2	3,24

Zusammenfassung

Es wird eine einfache, für Routinezwecke geeignet erscheinende Methode ausführlich beschrieben, mit der die Zellzahl pro Milligramm reiner Knochenmarkbröckel bestimmt werden kann. Die Zählungen wurden mit einem elektronischen Blutkörperchenzählapparat durchgeführt, die Reproduzierbarkeit der Befunde ist gut.

Summary

Determination of the absolute cell count in bone marrow particles.

A simple method appearing to be suitable for routine purposes is described in detail with which the cell count per mg of pure bone marrow particles can be determined. The counts were performed with an electronic blood cell count apparatus, with good reproducibility of the findings.

Résumé

Une méthode simple et qui paraît adaptée à la pratique courante est décrite en détail, par laquelle le nombre de cellulose par mg. de moelle osseuse pure peut être déterminé. Les numérations sont faites avec un appareil électronique pour numération de cellulose sanguines. La constance des résultats obtenus est satisfaisante.

Literatur

1. v. BOROVICZÉNY, K. G., Zur Technik der Sternalpunktion. Schweiz. med. Wschr. **90** (1960) 1202.
2. v. BOROVICZÉNY, K. G., R. GIENKE und E. BAUMGARTEN, Erythrozytenzählung mit einem elektronischen Apparat. Wien. Z. inn. Med. **42** (1961) 267–278.
3. DIWANY, M., Sternal marrow puncture in children. Arch. Dis. Childh. **15** (1940) 159–170 (cit. 13).
4. FLY, M. N., and E. R. POWSNER, Electronic counting of cells from human bone marrow. Amer. I. Clin. Path. **36** (1961) 224–226.
5. FELDSTEIN, S., A method of studying the effect of serum on tissues. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **12** (1929), 187–191 (cit. 9).
6. GREIF, St., Methodische Unterlagen zu einer quantitativen Auswertung des Sternalpunktates. Folia haemat. **59** (1938) 328–340.
7. GREIF, St., Die Sternalpunktion und die Versuche zu ihrer quantitativen Auswertung. Med. Welt **11** (1937) 847–851.
8. ISAACS, R., The bone marrow in agranulocytosis. Arch. Path. **12** (1931) 142.
9. ISAACS, R., Quantitative studies on the number of cells in the bone marrow. J. Clin. Invest. **2** (1932) 9.
10. ISAACS, R., The bone marrow in anemia. Amer. I. Med. Sci. **193** (1937) 181–191.
11. LOSSEN, J., Über das Verhalten des Knochenmarkes bei verschiedenen Erkrankungen des Kindesalters. Virchows Arch. path. Anat. **200** (1910) 258–320.
12. VAN OYE, E., Recherches sur la composition de la moelle osseuse chez les enfants. Rev. belge path. **21** (1952) 355ff. (cit. 13).
13. ROHR, K., Das menschliche Knochenmark, 3. Aufl., pp. 13–15. Thieme, Stuttgart 1960.

14. SANDKÜHLER, S., und E. GROSS, Normal bone marrow total cell and differential values by quantitative analysis of particle smeers. *Blood* **11** (1956) 856–862.
15. SANDKÜHLER, S., Über Sinn und Vorteil quantitativer Knochenmarkbeurteilung. *Leitz Mitt. Wiss. Techn.* **1**, Sept. 1959, **3**.
16. SCHNETZ, H., und S. GREIF, Die Leukopenie bei Grippe im Sternalmark. *Z. klin. Med.* **132** (1937) 128–133.
17. SEGERDAHL, E., Über die Sternalpunktion. *Acta med. Scand. Suppl.* **64** (1935) 28–34.
18. VOGEL, P., and F. A. BASSEN, Sternal marrow of children in normal and in pathologic states. *Amer. J. Dis. Childh.* **57** (1939) 245–268.
19. YOFFEY, I. M., and N. PARNELL, *Brit. Med. J.* **78** (1944) 109ff. (cit. 20).
20. YOFFEY, I. M., W. K. METCALF and V. NAIRN, Effect of ACTH and suprarenal extract on the bone marrow. *Brit. Med. J.* **1951/I** 660–665.
21. YOFFEY, I. M., Bone marrow. *Brit. Med. J.* **1954/II** 193–197.

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Freiburg i. Br.
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. L. Heilmeyer)

Leukozytenzählung mit einem elektronischen Apparat¹⁾

Von

K. G. v. Boroviczény und E. Baumgarten

(Mit 6 Abbildungen und einer Tabelle)

In einer früheren Arbeit haben wir über „Erythrozytenzählung mit einem elektronischen Apparat“ (5) berichtet. In der erwähnten Arbeit wurde der elektronische Apparat „Celloscope“ genau beschrieben und wir setzten uns mit der Problematik der Erythrozytenzählung in der Zählkammer und in diesem elektronischen Zählapparat auseinander. In Fortführung dieser Arbeit möchten wir nun über unsere Versuche betreffend die Leukozytenzählung berichten.

Die Leukozyten wurden bekanntlich vor nahezu 200 Jahren von *Hewson* (12) entdeckt, und die ersten Leukozytenzählungen wurden 100 Jahre später von *Malassez* durchgeführt. Die Leukozytenzählmethode wurde weiterentwickelt durch die Einführung der *Türkschen* Lösung und durch die Verbesserung der Zählkammer durch *Bürker*. Seither hat sich aber nichts mehr verändert und wir zählen die Leukozyten heute noch wie vor 50 Jahren — leider mit einem erheblichen Fehler. Über die bedeutenden Fehler der Leukozytenzählung in der Zählkammer wurde bereits vielfach berichtet (4, 10, 16, 19, 11 usw.); der mittlere Fehler (bei normalen Leukozytenzahlen von 6000 bis 7000) liegt, wie wir dies auch an Hand eigener Untersuchungen bestätigen konnten, bei $\pm 15\%$! Wenn wir bei der Erythrozytenzählung sagten, die Kammerzählung erbringe nur einen Orientierungswert, so gilt dies im gesteigerten Maße für die Leukozytenzählung.

¹⁾ Kurzfassung der Dissertationsarbeit von E. Baumgarten

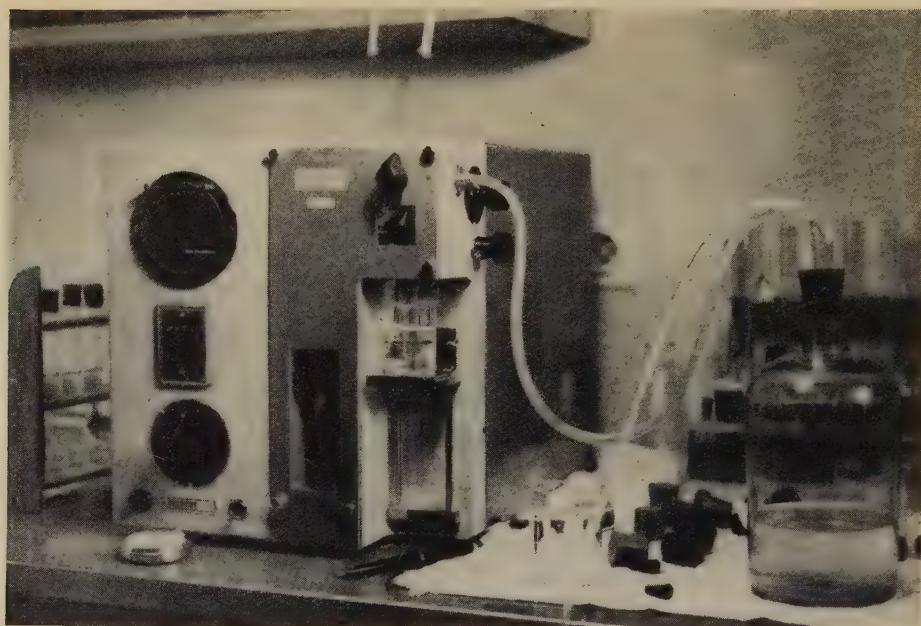


Abb. 1. Das Celloscope.

Das „Celloscope“ (Abb. 1) wurde von uns mitsamt seiner Vorzüge und Fehler bereits ausführlich beschrieben (5). In derselben Arbeit wurde auch eine detaillierte Fehleranalyse der Zählkammermethode vorgenommen. Im folgenden soll nun auf die von der Erythrozytenzählung abweichenden Eigenheiten der Leukozytenzählung eingegangen werden.

Fehler der Leukozytenzählung

Blutabnahme und Verdünnungsfehler

Das Blut wird zur Leukozytenzählung wie auch zur Erythrozytenzählung aus der mit einem Schaumgummischwämmchen gereinigten Fingerbeere abgenommen. Als erstes wird eine Blutverdünnung 1:200 hergestellt, indem 0,02 ml Blut in 4 ml Trispufferlösung nach *Hamilton-Patterson-Jacobson* (5) eingespült werden. Aus dieser ersten Verdünnung können 0,05 ml zur Herstellung der zweiten Verdünnungsstufe für die Erythrozytenzählung entnommen werden, der Rest wird mit 0,05 ml 1%iger Saponin-Lösung versetzt, mit physiologischer Kochsalzlösung auf 16 ml weiterverdünnt und danach die Leukozytenzahl bestimmt. Um uns über den Pipettierfehler zu orientieren, haben wir mit einer Anzahl verschiedener Pipetten diesbezügliche Untersuchungen angestellt (Tabelle 1). Wir gingen dabei so vor, daß bei den Makropipetten (1 bis 5 ml) jeweils zehnmal eine wäßrige Lösung pipettiert wurde, wonach die pipettierte Menge auf der analytischen Waage gewogen wurde. Bei den Mikropipetten (0,02 ml) wurde Blut mit der *Drabkinschen* Lösung verdünnt und die Farbe der Lösung nach 20 Minuten spektralphotometrisch (bei 540 nm) ermittelt. An Hand der Ergebnisse konnte dann der mittlere Pipettierfehler (Standardabweichung) berechnet werden. Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegen bei den Makropipetten die Vorteile der automatischen Linson-Pipette (5) klar auf der

Tabelle 1. Pipettierfehler

Pipette	Substrat	Standard- abweichung
Vollpipette, 1 Marke	5 ml wäßrige Lösung	$\pm 0,15\%$
Linson-Pipette	4 ml " "	$\pm 0,16\%$
Hohn-Pipette	1 ml " "	$\pm 0,3\%$
Mikrobürette, 2/0,01 ml	1 ml " "	$\pm 0,4\%$
Vollpipette, 1 Marke	1 ml " "	$\pm 0,9\%^{1)}$
Vollpipette, 2 Marken	1 ml " "	$\pm 1,5\%^{1)}$
Meßpipette, 10/0,1 ml	1 ml " "	$\pm 2,9\%^{1)}$
Lang-Levy-Pipette	0,02 ml Blut	$\pm 0,6\%$
Barrolier-Pipette	0,02 ml " "	$\pm 0,7\%$
Meßpipette, 0,1/0,001	0,02 ml " "	$\pm 0,7\%$
Sahli-Pipette	0,02 ml " "	$\pm 0,9\%$
Hirschfeld-Pipette	0,02 ml " "	$\pm 1,1\%$
Sanz-Pipette	0,02 ml " "	$\pm 1,1\%$

¹⁾ Routinemäßig pipettiert.

Hand. Zwar ließen sich auch mit einer gewöhnlichen Vollpipette gleichgute Resultate erzielen, jedoch wurden diese nur durch besonders sorgfältiges Arbeiten für diese Tabelle erreicht. Dies geht klar hervor aus dem Vergleich mit den unverhältnismäßig schlechteren Ergebnissen, die bei routinemäßiger Arbeit (die pipettierende Person wußte dabei nicht, daß ihre Arbeit kontrolliert wird) mit Vollpipetten erzielt wurden. Mit den Mikropipetten konnten durchweg gute Ergebnisse erzielt werden. Beim routinemäßigen Betrieb geben aber auch hier die automatischen Präzisionspipetten (Abb. 2) bessere Ergebnisse als die Sahli-Pipette oder die Meßpipette. Obwohl die mit der Sanz-Pipette erzielten Resultate nicht so gut ausfielen wie mit anderen Modellen, bevorzugen wir dennoch diesen Pipettentyp wegen seiner Vorteile: Die Pipette ist aus einem unzerbrechlichen Kunststoff mit hydrophober Oberfläche gefertigt, so daß die Pipette nach Gebrauch nur kurz durchgespült werden muß, das Trocknen entfällt (Bezugsquelle: Beckmann, München).

Hämolysfehler

Bei der elektronischen Leukozytenzählung ist die entsprechende Hämolys ein besonderes Problem. Während man bei der visuellen Kammerzählung die Leukozyten sieht (erkennen kann) und die noch erkennbaren Erythrozytenstromata keinerlei Fehler verursachen, werden bei der elektronischen Zählung alle vorhandenen Partikelchen gezählt. Es müssen also die Erythrozyten vollkommen hämolysiert werden, ohne daß man dabei die Leukozyten schädigt. Wir haben in zahlreichen Versuchen die hämolysierenden Eigenschaften von Saponin, Natriumdesoxycholat, Digitonin-Natriumoleat, Lissin, Marlon TP 350, Tergitol, Anionic 4, Anionic 7, Triton X 100, Sandoz L 6 und Cetavlon untersucht. Am besten hat sich die Saponin-Hämolys bewährt. Praktisch gingen wir dabei folgendermaßen vor: Es wird eine 1%ige Saponin-Lösung hergestellt, die sich bei Zimmertemperatur 2 bis 3 Tage in ihrer hämolytischen Wirksamkeit konstant verhält. Von dieser Lösung wird der weiter oben erwähnten ersten Verdünnung (1 : 200) ein Tropfen zugefügt (etwa 0,05 ml). Es wird vorsichtig durchgemischt, um das Entstehen von Schaum zu vermeiden, und in einigen Sekunden wird die Suspension lackfarben. Nun wird durch Zufügung von 12 ml physiologischer Kochsalzlösung die Endverdünnung 1 : 800 hergestellt, es wird wieder sorgfältig umgerührt, und nach 1 bis 2 Minuten

Wartezeit, spätestens aber innerhalb einer halben Stunde kann die Leukozytenzählung durchgeführt werden. Bei entsprechender Verstärkerstellung (siehe unten) werden nun alle Leukozyten, aber keine Erythrozyten oder Erythrozytenstromata gezählt. Die erste Verdünnung kann vor der Hämolyse bis zu 24 Stunden stehen gelassen werden, ohne daß sich die Leukozytenzahl ändert. Hier sei noch folgendes vermerkt: *Akroyd* und Mitarbeiter (1) geben an, daß bei der Verwendung von Triton X 100 bei einer entsprechenden Versuchsanordnung die Erythrozyten und

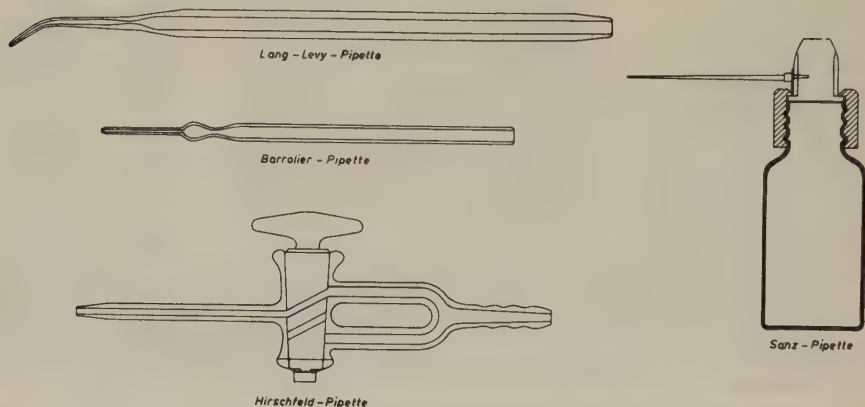


Abb. 2. Automatische Mikropipetten.

die *Lymphozyten* lysiert werden, so daß eine selektive Granulozytenzählung durchgeführt werden kann. Wir konnten dies nicht bestätigen, vielmehr schien es uns bei phasenoptischen Untersuchungen, daß die Granulozyten eher noch vor den Lymphozyten zerstört werden.

Zählfehler

Da nach der Hämolyse die Erythrozytenstromata nicht vollkommen verschwinden, sondern zu Partikelchen agglutinieren, die aber wesentlich kleiner als die Leukozyten sind, müssen diese bei der Leukozytenzählung durch entsprechende Einstellung des Diskriminators eliminiert werden. Wie bereits bei der Erythrozytenzählung beschrieben worden ist (5), befindet sich am Celloscope ein sogenannter Diskriminator mit kontinuierlichem Einstellbereich. Mit diesem Diskriminator können schwächere Impulse (kleinere Partikelchen) ausgeschaltet werden. Wird der Zählvorgang bei verschiedenen Diskriminatorereinstellungen wiederholt, dann werden erst sämtliche Partikelchen gezählt, dann nur die größeren und am Ende nur die größten. Wenn dieses Experiment mit der Leukozytensuspension durchgeführt wird und die Zählergebnisse bei den verschiedenen Diskriminatorstellungen in ein Koordinatensystem eingetragen werden, so erhält man eine „Summenkurve“. Auf dieser Kurve sieht man nach einem anfänglichen Abfall eine kleine Plateaubildung und dann einen erneuten Abfall (Abb. 3). Bei der Leukozytenzählung muß der Diskriminator im Bereich dieses Plateaus eingestellt werden, womit die Erythrozytenstromatareste aus der Zählung ausgeschaltet werden. Da durch Altern der Röhren die Empfindlichkeit des Apparates sich mit der Zeit ändern kann, sollte die richtige Diskriminatorereinstellung in der hier beschriebenen Weise von Zeit zu Zeit kontrolliert werden.

Die bei der Erythrozytenzählung genannten Zählfehler, wie Fehler des Zählvolumens, statistischer Fehler und systematischer Zählfehler, treten bei der Leukozytenzählung selbstverständlich ebenso auf wie bei der Erythrozytenzählung. Dabei ist der statistische Fehler sowohl bei der Kammerzählung wie auch bei der elektronischen Zählung größer als bei der Erythrozytenzählung, da bei der Leukozyten-

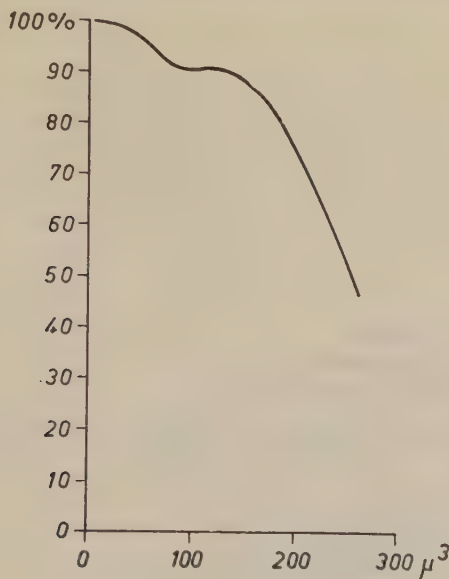


Abb. 3. Leukozytensummenkurve.

zählung weniger Zellen gezählt werden. Bei der gleichen Leukozytenzahl werden mit dem Celloscope 32mal soviel Leukozyten gezählt als in der Zählkammer bei der dort üblichen Zählfläche von 4 mm^2 . Diese bedeutet, daß der statistische Zählfehler beim Celloscope nahezu sechsmal kleiner ist als bei der Kammerzählung. Ein Versuch bestätigt diese Erwägungen (Abb. 4).

Da bei Hyperleukozytosen durch den systematischen Zählfehler (2 Zellen treten gleichzeitig durch die Kapillare und geben nur einen Ausschlag) das Gerät einen zu niedrigen Wert angeben würde, sollte bei Leukozytenzahlen über 30.000 eine weitere Verdünnung 1 : 8000 angesetzt und diese gezählt werden.

In Übereinstimmung mit anderen Autoren konnten auch wir feststellen, daß bei schweren Leukopenien (Werte unter 2000) vom Apparat aus ungeklärten Gründen zu hohe Zählergebnisse angezeigt werden. In solchen Fällen muß die Zählung mit einer geringeren Blutverdünnung vorgenommen werden.

Nach unseren Untersuchungen beträgt der mittlere Fehler der Leukozytenzählung bei normalen Leukozytenzahlen etwa $\pm 3\%$.

Leukozytenvolumenverteilungskurven und andere Versuche

Neben der verlässlichen Bestimmung der Leukozytenzahl wäre es von großem Interesse und Nutzen, wenn mit Hilfe des elektronischen Zählapparates auch einige Aussagen über das Differentialblutbild gemacht werden könnten. Um diese Frage zu untersuchen, haben wir zahlreiche Leukozytenvolumenverteilungskurven aufge-

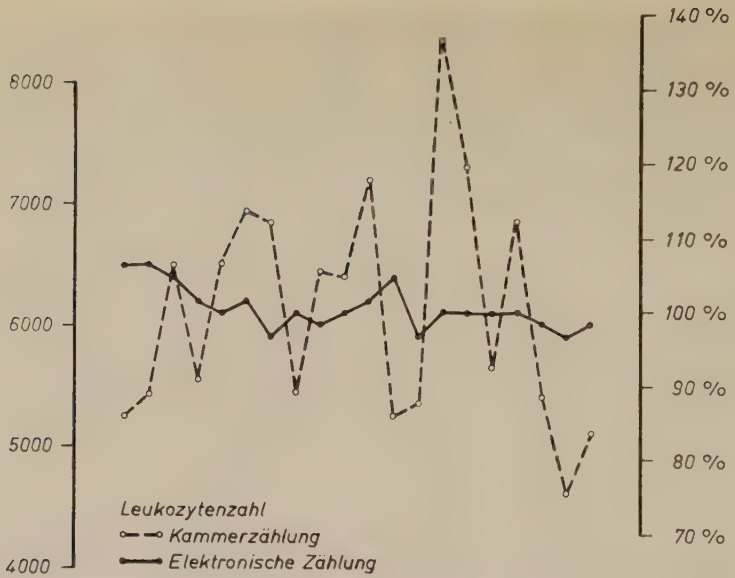
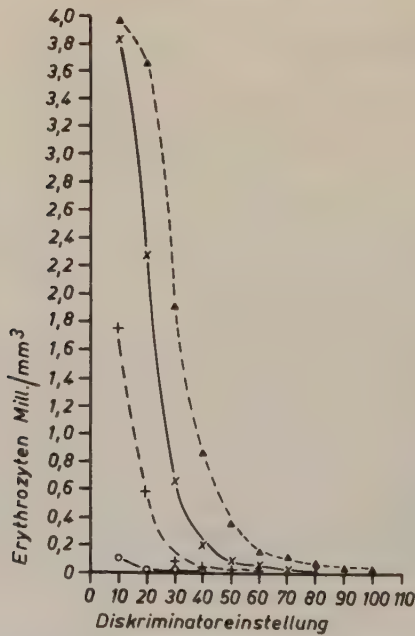


Abb. 4. Dasselbe heparinisierte Blut wurde 20mal mit der Zählkammer und 20mal mit dem Celloscope gezählt.



Stromregler 1/0 (keine Ausschläge)	+ --- Stromregler 1/60
" 1/20 (")	x — " 1/80
○ — " 1/40	▲ --- " 1/100

Abb. 5 a bis d. Erythrozytensummenkurven bei verschiedenen Stromreglereinstellungen.

nommen. Wie bereits erwähnt, kann man durch verschiedene Diskriminator-einstellungen die kleinsten, kleinen, größeren usw. Zellen gesondert zählen. Wenn man die Zählergebnisse, die bei den verschiedenen Diskriminatoreinstellungen gewonnen wurden, voneinander subtrahiert und diese Werte in ein Koordinatensystem einträgt, erhält man eine Volumenverteilungskurve. Verschiedene Erythro-

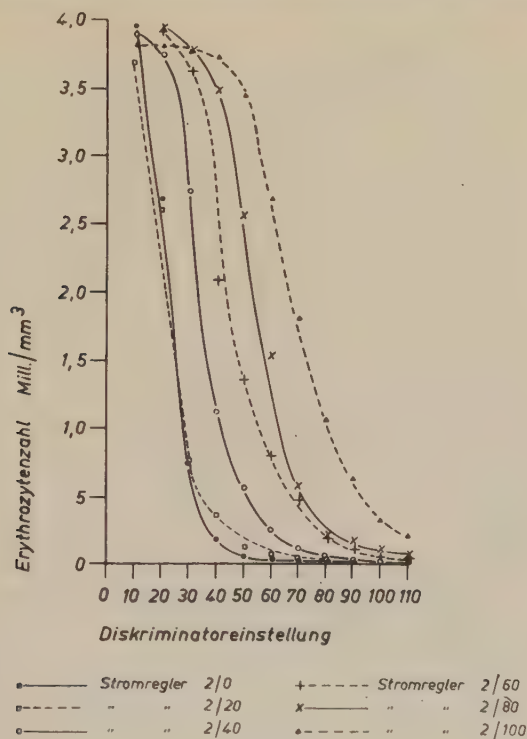


Abb. 5 b

zytenvolumenverteilungskurven wurden von uns bereits früher mitgeteilt (5). Die Umrechnung der Diskriminatoreinstellungen in μ^3 konnte dabei so vorgenommen werden, daß das mittlere Erythrozytenvolumen sowohl aus den Volumenverteilungskurven wie auch an Hand der Hämatokritbestimmung berechnet wurde. Da die Leukozyten zum Teil wesentlich größer als die Erythrozyten sind, mußte bei der Aufnahme der Leukozytenverteilungskurven die Stromverstärkereinstellung des Apparates geändert werden. Um die Diskriminatoreinstellungen auch bei dieser Versuchsanordnung in μ^3 umrechnen zu können, wurden mit einer Erythrozytensuspension bei den verschiedensten Stromreglereinstellungen Summenkurven aufgenommen (Abb. 5 a bis d) und diese Kurven ausgemessen.

Die „normale“ Leukozytenvolumenverteilungskurve auf Abb. 6 zeigt den Mittelwert der Ergebnisse, die bei 47 gesunden Blutspendern gewonnen wurden. Es wurde sowohl natives Kapillarblut aus der Fingerbeere (ausgezogene Kurve) wie auch heparinisiertes Venenblut (gestrichelte Kurve) untersucht. Wie Vergleiche mit den Auszählungsergebnissen gleichzeitig angefertigter Blutaussstriche unter Berücksichtigung des Differenzierungsfehlers (21) anzuzeigen scheinen, dürfte ein

Zusammenhang zwischen dem Gipfel bei $120\mu^3$ und den Lymphozyten sowie zwischen dem Gipfel bei $640\mu^3$ und den Monozyten bestehen. Beim Vergleich der Ergebnisse fanden sich aber auch signifikante Unterschiede zwischen dem Zähl-ergebnis mit dem Celloscope und dem mikroskopisch ausgezählten Differentialblutbild, so daß noch keineswegs sichere Rückschlüsse aus der Leukozytenvolumen-

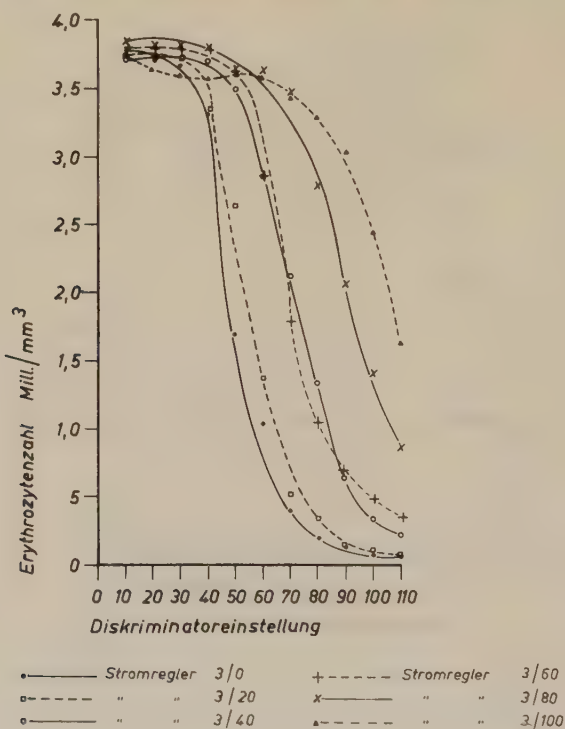


Abb. 5 c

verteilungskurve auf das Differentialblutbild geschlossen werden können. Dies mag auch damit zusammenhängen, daß beim Celloscope die Aufnahme einer Leukozytenvolumenverteilungskurve eine längere Zeit in Anspruch nimmt, wobei durch Einwirkung des elektrischen Stromes und des Saponins Veränderungen in den Leukozyten auftreten können. Neuerdings wurde ein Apparat in den Handel gebracht (7), mit dem vollautomatisch Volumenverteilungskurven in 1 bis 2 Minuten aufgenommen werden können. Es ist zu hoffen, daß mit diesem Apparat bessere Ergebnisse erzielt werden können, welche Hoffnung auch Mitteilungen von *Damminger* und *Graul* (11) zu berechtigen scheinen. Diese Autoren haben mit Hilfe einer sehr großen und aufwendigen Versuchsanordnung Leukozytenvolumenverteilungskurven aufgenommen und glauben, mit Sicherheit zwischen Lymphozyten und Granulozyten unterscheiden zu können.

In Anlehnung an die bekannte Eosinophilenkammerzählmethode haben wir auch zahlreiche Versuche angestellt, um die Zahl der Eosinophile mit dem Celloscope bestimmen zu können. Diese Versuche führten aber zu keinem positiven Ergebnis, da wir keine Substanz finden konnten, die die Erythrozyten und die übrigen Leuko-

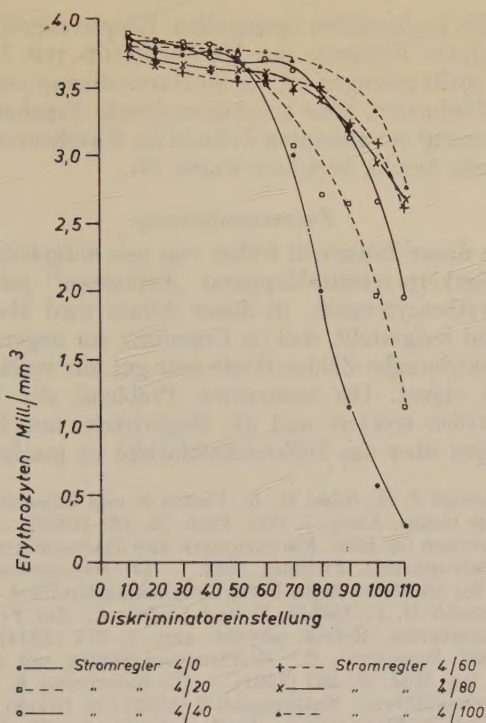


Abb. 5 d

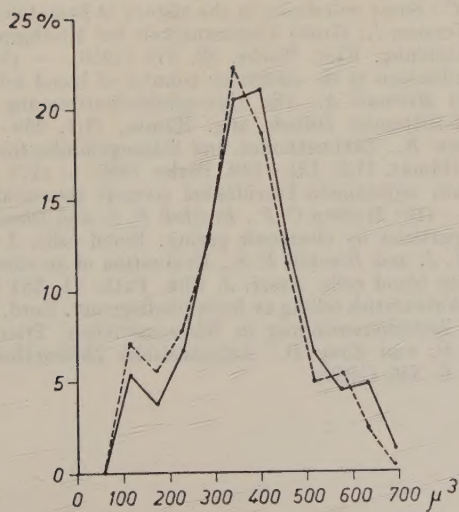


Abb. 6. Leukozyten-Volumenverteilungskurve. — natives Kapillarblut, ----- heparinisiertes Venenblut.

zyten lysiert, ohne die Eosinophilen anzugreifen. Ebenso negativ fielen unsere Versuche aus, die zellularen Elemente des Harnsediments mit Hilfe des Apparates zu zählen, da es uns nicht gelungen ist, die im Harnsediment auftretenden Kristalle in jedem Falle zu eliminieren. Sehr zufriedenstellende Ergebnisse ergaben unsere Versuche zur Bestimmung der absoluten Zellzahl im Knochenmarkbröckel, wie darüber an anderer Stelle bereits berichtet wurde (3).

Zusammenfassung

Wie bereits in dieser Zeitschrift früher von uns mitgeteilt wurde, eignet sich der elektronische Blutkörperchenzählapparat „Celloscope“ sehr gut zur exakten Bestimmung der Erythrozytenzahl. In dieser Arbeit wird über die Leukozytenzählung berichtet und festgestellt, daß im Gegensatz zur ungenauen Kammerzählmethode sich die elektronische Zählmethode sehr gut zur verlässlichen Ermittlung der Leukozytenzahl eignet. Die besonderen Probleme der Leukozytenzählung (Hämolyse usw.) werden erörtert und die Möglichkeit, mit Hilfe elektronischer Zählapparate Aussagen über das Differentialblutbild zu machen, untersucht.

Literatur. (1) Akeroyd J. H., Gibbs M. B., Vivans S. und Robinette R. W.: On counting leukocytes by electronic means. *Amer. J. Clin. Path.* 31, 188 (1959). — (2) Baumgarten E.: Zählung von Blutkörperchen im Blut, Knochenmark und Harnsediment mit einem elektronischen Gerät. *Dissertationsarbeit*, Freiburg 1962. — (3) Baumgarten E. und Boroviczény K. G. v.: Bestimmung der absoluten Zellzahl im Knochenmarkbröckel. *Folia Haemat. N. F.* im Druck. — (4) Blumtschli H. J., Rothlin E. und Undritz E.: Zur Frage der Existenz des sogenannten Leukozytensturzes. *Helvet. physiol. acta* 2, 377 (1944). — (5) Boroviczény K. G. v., Gienke R. und Baumgarten E.: Erythrozytenzählung mit einem elektronischen Apparat. *Wien. Zschr. inn. Med.* 42, 267 (1961). — (6) Boroviczény K. G. v.: Zur Standardisierung der Blutkörperchenzählung. *Nuklearmed.* 2 (1962) (im Druck). — (7) Ders.: Erfahrungen mit Blutkörperchenzählapparaten. *Ärztl. Laborat.* 8 161 (1962) — (8) Brecher G., Schneiderman M. und Williams G.: Evaluation of an electronic blood cell counter. *Amer. J. Clin. Path.* 26, 1439 (1956). — (9) Coster J. F.: Untersuchungen von Arbeitern, die ionisierender Strahlung ausgesetzt waren. *Nuklearmed.* 2 (1962) (im Druck). — (10) Dacie J. V.: *Practical haematology*. 2. ed., London 1956. — (11) Damminger K. und Graul E. H.: Zur hämatologischen Diagnostik des latenten Strahlenschadens. *Nuklearmed.* 2 (1962) (im Druck). — (12) Dreyfus C.: Some milestones in the history of hematology. *New York* 1957. — (13) Druckrey H. und Fromme I.: Grobe Ungenauigkeit bei Mischpipetten für die Erythrozyten- und Leukozytenzählung. *Klin. Wschr.* 28, 278 (1950). — (14) Gabrielli E. R. und Wertheimer M.: Standardisation of the electronic counter of blood cell. *Amer. J. Clin. Path.* 36, 277 (1961). — (15) Hittmair A.: Die Hämoglobinbestimmung und Blutkörperchenzählung. In: *Hirschfeld-Hittmairs Hdbch. allg. Hämat.* II/1, 239—318. Berlin 1933. — (16) Kleine N. und Plötner K.: Zählmethoden und Hämoglobinbestimmung. In: *Heilmeyer-Hittmairs Hdbch. ges. Hämat.* II/2, 121—129. Berlin 1959. — (17) Komán A., Czabafy L. und Tózsér O.: Automata sejtzámoló készülékkel szerzett tapasztalataink. *Kisér. orvostudom.* 13, 667 (1961). — (18) Mattern C. F., Brachett F. S. und Olson B. J.: Determination of number and size of particles by electronic gating: Blood cells. *J. Appl. Physiol.* 10, 56 (1957). — (19) Richar W. J. und Breakell E. S.: Evaluation of an electronic particle counter for the counting of white blood cells. *Amer. J. Clin. Path.* 31, 384 (1959). — (20) Rosenlund B. und Foss O. P.: Automatisk telling av hvite blodlegemer. *Nord. Med.* 63, 556 (1960). — (21) Rümke C. L.: Die Zelldifferenzierung in Blutaussstrichen. *Triangel* 4, 154 (1960). — (22) Ruhenstroth-Bauer G. und Zang D.: Automatische Zählmethoden: Das Coulter'sche Partikelzählgerät. *Blut* 6, 446 (1960).

Lebenslauf

Als Tochter des Diplomingenieurs Franz Baumgarten und seiner Ehefrau Erna, geb. Zander, wurde ich am 22. September 1936 in Stuttgart geboren.

In meinem zweiten Lebensjahr zogen meine Eltern nach Peine bei Hannover. Dort besuchte ich von 1942 bis 1947 die Wilhelmschule, und von 1947 bis zur Reifeprüfung im Jahre 1956 die Oberschule für Mädchen. Das Medizinstudium begann ich im Sommersemester 1956 an der Georg-August-Universität in Göttingen. Vom Wintersemester 1956/57 an war ich an der medizinischen Fakultät der der Universität Freiburg immatrikuliert, wo ich im Sommersemester 1958 die ärztliche Vorprüfung bestand. Die klinische Ausbildung begann ich im Wintersemester 1958/59 in Göttingen. Das zweite klinische Semester studierte ich in Innsbruck und war seit dem Wintersemester 1959/60 wieder in Freiburg eingeschrieben. Im Frühjahr 1960 erhielt ich von Herrn Dr. med. K. G. v. Boroviczény das Thema zu meiner Dissertationsarbeit, die ich im hämatologischen Labor II der medizinischen Universitätsklinik ausführte. Im Anschluß an das Sommersemester 1961 bestand ich in Freiburg das ärztliche Staatsexamen. Seit April 1962 arbeite ich als Medizinalassistentin im DRK-Krankenhaus der Schwesternschaft vom Schlump in Hamburg.